



Universidade Estadual de Maringá
Centro de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas
Área de Concentração: Biologia Celular e Molecular

Laboratório de Inovação Tecnológica no Desenvolvimento de
Fármacos e Cosméticos

APOSTILA DO MINI-CURSO:

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE PRODUTOS NATURAIS E
SINTÉTICOS

Angelo de Oliveira Caleare

Francielle Pelegrin Garcia

Franciele Peron

Hélito Volpato

Jean Henrique da Silva Rodrigues

Solange Cardoso Martins

Talitha Fernandes Stefanello

Orientador: Celso Vataru Nakamura

Maringá

Julho - 2013

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	3
2. OBJETIVOS.....	5
2.1. Geral.....	5
2.2. Específicos.....	5
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	6
3.1. Micro-organismos.....	6
3.2. Padronização da suspensão de micro-organismos.....	6
3.3. Atividade antifúngica pelo método de microdiluição (Concentração inibitória mínima)	6
3.4. Atividade antibacteriana pelo método de difusão em ágar (halo de inibição) ...	7
3.5. Ensaio antiproliferativo para avaliação da atividade antiprotozoário.....	7
Pesagem e diluição das drogas	7
3.6. Ensaio de citotoxicidade	9
3.7. Microscopia eletrônica de varredura.....	11
4. REFERÊNCIAS	12

1. INTRODUÇÃO

O nascimento da quimioterapia antimicrobiana ocorreu há mais de 100 anos pelo bacteriologista alemão Paul Erlich. Entusiasmado com a eficácia dos compostos derivados do arsênico para o tratamento da doença do sono, ele convocou uma equipe para encontrar um composto que combatesse a sífilis (SEPKOWITZ, 2011). Seu sonho era encontrar uma substância que tivesse afinidade pelos patógenos sem afetar as células do hospedeiro, que foi nomeada por ele como “bala mágica”. Foram mais de 600 compostos sintetizados, até que o composto número 606 (arsfenamina – nome comercial: Salvarsan) se enquadrou neste quesito para a época (BOSCH & ROSICH, 2008).

A arsfenamina foi o composto de escolha para o tratamento da sífilis até a descoberta ao acaso da penicilina por Alexander Fleming em 1928. Podemos dizer que foi Fleming que desenvolveu as técnicas *in vitro* para a descoberta de novos antimicrobianos (AMSTERDAM, 2005). Nota-se então que a corrida para a descoberta de novos antimicrobianos depende de muito trabalho e também de sorte, esta como disse Louis Pasteur só favorece a mente preparada.

Nosso laboratório vem se destacando como referência na prospecção de drogas que possuam atividade antimicrobiana, dentre os micro-organismos testados incluem bactérias gram-positivas (*Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus*), bactérias gram-negativas (*Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*), leveduras (*Candida albicans*) e protozoários (*Leishmania amazonensis* e *Trypanosoma cruzi*). O presente minicurso se propõe a apresentar as principais técnicas utilizadas no estudo de antimicrobianos, sendo o enfoque das metodologias no estudo de novos compostos com atividade anti-*Trypanosoma*.

Trypanosoma cruzi, agente etiológico da doença de Chagas, é um protozoário da ordem Kinetoplastida, família *Trypanosomatidae*, caracterizado pela presença de um flagelo e uma mitocôndria, descoberto em 1909 por Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas. (NEVES, 2005; SILVA JÚNIOR *et al.*, 2010). A distribuição dos vetores e reservatórios silvestres do *T. cruzi* nas Américas se estende desde os Estados Unidos à Argentina e Chile (COURA & VIÑAS, 2010).

Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) indicam a existência de 16-18 milhões de infectados pelo *T. cruzi*, contudo, Pinto Dias (2007) estima que em cerca de 18 países endêmicos existam de 12-14 milhões de indivíduos infectados com uma

incidência anual de 200.000 casos e milhares de mortes, e aproximadamente 100 milhões de pessoas vivendo em áreas de risco. No Brasil, predominam os casos crônicos da doença de Chagas decorrentes de infecções adquiridas no passado, com aproximadamente três milhões de indivíduos infectados.

Os insetos vetores são percevejos da ordem Hemiptera pertencentes à família *Reduviidae*, sendo que machos e fêmeas só se desenvolvem e procriam realizando a hematofagia desde a primeira fase da vida até adulto. Cinco espécies têm especial importância na transmissão da doença ao homem. Por ordem de importância: *Triatoma infestans*, *T. braziliensis*, *Panstrongylus megistus*, *T. pseudomaculata* e *T. sordida* (NEVES, 2005).

O ciclo de vida do *T. cruzi* envolve a passagem obrigatória por hospedeiros vertebrados (homem e mamíferos) e invertebrados (triatomíneos), em uma série de diferentes formas de desenvolvimento. As tripomastigotas sanguíneas ingeridas pelo inseto vetor se diferenciam em epimastigotas proliferativas, que por sua vez se diferenciam em tripomastigotas metacíclicas no intestino posterior do inseto. As formas metacíclicas invadem as células do hospedeiro vertebrado e se transformam em formas amastigotas, que sofrem novo processo de diferenciação em tripomastigotas, responsáveis pela disseminação da infecção (SILVA JÚNIOR *et al.*, 2008).

As formas habituais de transmissão da doença de Chagas humana reconhecidas são aquelas ligadas diretamente ao vetor, à transfusão de sangue, à via congênita (CARLIER, 2007), e mais recentemente, as que ocorrem via oral, pela ingestão de alimentos contaminados (PINTO DIAS, 2006). Mecanismos menos comuns envolvem acidentes de laboratório, manejo de animais infectados (HERWALDT, 2001), transplante de órgãos (CAMPOS *et al.*, 2008) e pelo leite materno (PINTO DIAS, 2006). Clinicamente a infecção é caracterizada por uma fase aguda, seguida da fase crônica, na qual a maioria dos pacientes se mantém assintomáticos, (DANTAS *et al.*, 2006). Os sinais e sintomas, na fase aguda, se manifestam em casos mais extremos, normalmente na maioria dos pacientes esta fase passa despercebida por não ter sido reconhecida ou devido à escassez ou ausência de manifestações clínicas (PRATA, 2001). Cerca de 60-70% dos pacientes nunca desenvolvem a doença clinicamente aparente, esses pacientes apresentam a forma indeterminada da doença, em que o paciente se apresenta assintomático. (PRATA, 2001; RASSI JÚNIOR *et al.*, 2010). Os restantes 30-40% dos pacientes poderá posteriormente evoluir para uma doença grave e morte prematura. As manifestações clínicas típicas desta fase estão relacionadas com o

envolvimento do coração, esôfago, cólon, ou uma combinação e estão agrupadas em três formas principais: cardíaca, digestiva e cardiodigestiva. Normalmente 10-30 anos após a infecção inicial surgirão os sintomas clínicos da fase crônica (DANTAS *et al.*, 2006; RASSI JÚNIOR *et al.*, 2010).

A quimioterapia específica com os medicamentos disponíveis, os nitroderivados nifurtimox (Lampit®) ou, preferencialmente, o benzonidazol (Rochagan® ou Radanil®) têm sido indicado para o tratamento da fase aguda (PRATA, 2001, SILVA JÚNIOR *et al.*, 2008), com uma taxa de cura de 50-70% (CANÇADO, 1985), em indivíduos cronicamente infectados a taxa de cura é baixa (8-20%) (CANÇADO, 1985, GALVÃO *et al.*, 1993, COURA & CASTRO, 2002). Esses compostos podem causar toxicidade sistêmica (TONIN *et al.*, 2010) com sérios efeitos colaterais, sendo os mais importantes hipersensibilidade (rash, febre, edema generalizado, linfadenopatia, dores musculares e nas articulações), depressão da medula óssea (neutropenia, púrpura trombocitopênica), polineuropatia periférica. A dose diária para benzonidazol é 5-7 mg/kg de peso corpóreo e 8-10 mg/kg de peso corpóreo para o nifurtimox durante 30 ou 60 dias (PRATA, 2001).

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Proporcionar aos alunos conhecimentos sobre técnicas básicas utilizadas para investigar atividade biológica de substâncias naturais e sintéticas frente aos principais micro-organismos utilizados para a pesquisa de novas drogas.

2.2. Específicos

- Verificar a atividade antibacteriana e antifúngica de um composto sintético;
- Verificar uma possível atividade tripanocida do composto sobre a forma epimastigota de *T. cruzi*;
- Verificar a citotoxicidade do composto sobre a linhagem de células animal LLCMK₂;
- Verificar se o composto causa alterações na morfologia do protozoário através de microscopia eletrônica de varredura.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Micro-organismos

As atividades antibacteriana e antifúngica serão avaliados com as seguintes cepas: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* ATCC 6623 e *Candida albicans* ATCC 10231.

3.2. Padronização da suspensão de micro-organismos

As suspensões microbianas serão padronizados de acordo com o Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2009) para as bactérias e (CLSI, 2008) para leveduras. As bactérias serão cultivadas em caldo Muller-Hinton (MHB) durante 18-24 h e leveduras em caldo Sabouraud dextrose (Merck) durante 48-72 h. Após o crescimento, a suspensão microbiana será padronizada em solução salina estéril a uma turbidez equivalente a 0,5 escala de McFarland (aproximadamente $1-2 \times 10^8$ CFU / mL para as bactérias e $1-5 \times 10^6$ CFU / mL para *Candida* spp.).

3.3. Atividade antifúngica pelo método de microdiluição (Concentração inibitória mínima)

Uma solução de 2mg/ml do composto será preparada usando caldo Sabouraud dextrose e DMSO (solvente). Cem microlitros de caldo Sabouraud dextrose serão adicionados a cada poço da placa de 96 poços. Um volume de 100 μ l da solução do composto será adicionado aos poços da primeira linha e, em seguida uma diluição em série será realizada, resultando em concentrações que variam de 3,9 μ g / mL a 1000 μ g / ml. Na décima, décima primeira e décima segunda linhas serão utilizadas como controle de inóculo, droga, e os controles de meio de cultura, respectivamente. Subsequentemente, 5 μ l da suspensão de microrganismos previamente padronizada será adicionado a todos os poços, e a placa será incubada a 37 ° C por 24-48 h. A concentração inibitória mínima (CIM ou MIC) será indicada pela ausência de turvação no meio de cultura.

3.4. Atividade antibacteriana pelo método de difusão em ágar (halo de inibição)

Será utilizado um swab de algodão estéril e este será mergulhado na suspensão de bactérias após ajustar a turbidez da suspensão de inóculo. O swab deve ser girado várias vezes e apertado firmemente contra a parede interna do tubo, acima do nível do líquido. Isso ajudará a retirar qualquer excesso de inóculo no swab. As bactérias serão inoculadas na superfície da placa de ágar Mueller-Hinton esfregando o swab em toda a sua superfície. Repete-se o procedimento esfregando outras duas vezes, girando a placa aproximadamente 60° cada vez, a fim de assegurar a distribuição uniforme do inóculo por toda a placa. Como passo final, passa-se um swab na margem da placa de ágar.

Os compostos em teste serão colocados num poço feito com um cilindro de metal na placa de Agar já semeada e em seguida elas serão colocadas na estufa, a 37° C, por 24 h. Após a incubação examina-se cada placa, verificando se foi observada a inibição ou crescimento das bactérias nas regiões próximas a amostra, mediante a formação ou não de halos de inibição. O halo de inibição será considerado a área sem crescimento detectável a olho nu.

3.5. Ensaio antiproliferativo para avaliação da atividade antiprotozoário

O ensaio antiproliferativo é uma das etapas experimentais iniciais na busca de substâncias com atividade tripanocida. Como objetivo geral do experimento busca-se determinar o valor de IC50 para dada substância, ou seja, a concentração de droga na qual ocorra a inibição de 50% dos protozoários após 96 h de tratamento, quando comparado a um grupo controle.

Pesagem e diluição das drogas

- Pesar a droga utilizando tubos Eppendorf® estéreis (**1 mg** para **compostos isolados** e 10 mg para extratos e frações);
- Adicionar 100 µL de Dimetilsulfóxido (DMSO) ao eppendorf, agitar até completa dissolução da droga e completar com 900 µL de meio LIT (solução estoque: 1 mg/mL);
- Identificar 4 outros tubos eppendorf estéreis (Concentrações: **500, 100, 50 e 10 µg/mL**) para realizar a diluição da droga;

- Adicionar aos tubos identificados, respectivamente, 500, 800, 500 e 800 μL de LIT;
- Homogeneizar e transferir 500 μL da solução estoque para o tubo 1 (C: 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$);
- Homogeneizar o tubo 1 e transferir 200 μL deste para o tubo 2 (C: 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$);
- Homogeneizar o tubo 2 e transferir 500 μL deste para o tubo 3 (C: 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$);
- Homogeneizar o tubo 3 e transferir 200 μL deste para o tubo 4 (C: 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

Padronização do inóculo

- Formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* cepa Y serão previamente cultivados em meio LIT suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) por 4 dias à 28°C;
- Homogeneizar o tubo de cultura, retirar 20 μL e adicionar o volume a um eppendorf contendo 980 μL de formalina 3%;
- Contar as formas epimastigotas presentes no quadrante central (região A) da Câmara de Neubauer (Fig. 1), obter a média dos dois campos de contagem, multiplicar pela diluição (50) e pelo fator de correção da câmara (10^4), obtendo-se um número **X** de protozoários;

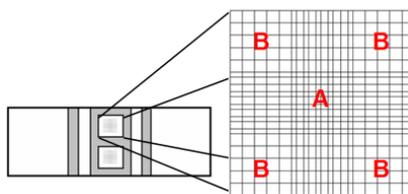


Figura 1. Hematímetro ou Câmara de Neubauer.

- O inóculo para a realização do ensaio antiproliferativo deve ser de 10^6 parasitas/mL, sabendo que em 1 mL existe um número **X** de parasitos realiza-se uma regra de 3 para descobrir qual volume **V** é necessário utilizar para obter 10^6 parasitos/mL;
- Como o experimento em geral é montado simultaneamente para duas drogas em uma placa de 24 poços, é preciso padronizar o volume real (VR) de inóculo a ser coletado para 25 mL (volume **V** x 25= VR).

Preparo do pool

- O pool deve ser preparado em um tubo falcon, sendo composto por 10% de SFB (2,5 mL), 10% da droga (2,5 mL distribuído diretamente nos poços), o volume de inóculo calculado e meio LIT em q.s.p. para 25 mL, além de 33,75 µL de gentamicina.

Montagem e Leitura do experimento

- Transferir 100 µL de cada eppendorf contendo as drogas para dois poços (ensaio em duplicata) da placa, para os poços controle transferir 100 µL de LIT;
- Adicionar 900 µL do pool a cada poço, obtendo-se uma concentração final 10 vezes menor que a obtida no eppendorf;
- Homogeneizar a placa e incubar a 28 °C por 96 h;
- Após o tempo de ensaio realizar a contagem de parasitos em câmara de Neubauer.

3.6. Ensaio de citotoxicidade

O Ensaio de citotoxicidade é uma metodologia de ampla utilização que permite verificar o quão tóxica é uma substância para determinada célula. Em nosso caso usaremos células da linhagem LLCMK₂ (Célula epitelial de rim de *Macaca mulata*) como modelo.

Obtenção da monocamada de células

- Usar garrafas de cultura média com tapete de células fechado como fonte de inóculo;
- Retirar o meio de cultura (DMEM) das garrafas e lavar o tapete de células com PBS;
- Adicionar tripsina às garrafas e permitir que a enzima aja por aproximadamente 30 s;
- Observar as células ao microscópio invertido e caso estejam arredondadas bater no fundo da garrafa para completo descolamento do tapete de células;
- Adicionar meio de cultura até formar uma suspensão de 10 mL, reservar em gelo;
- Transferir 100 µL desta suspensão para um eppendorf contendo 900 µL de meio;

- Homogeneizar o conteúdo do eppendorf e proceder a contagem em Câmara de Neubauer (Fig 1), contando apenas as células presentes nos quatro quadrantes laterais (regiões B) de cada campo, dividindo o número total contado por quatro obtendo uma média;
- Multiplicar a média pelo fator de correção da câmara (10^4) e pela diluição (10);
- Proceder os cálculos tal como no ensaio antiproliferativo, sabendo que para o experimento de citotoxicidade é ideal um inoculo de $2,5 \times 10^5$ células;
- Preparar o pool contendo o volume de inóculo calculado, 10% de SFB, Meio de cultura em q.s.p. 10 mL e 12,5 μ L de gentamicina;
- Distribuir 100 μ L da suspensão homogeneizada em cada poço, deixando três poços vazios para usá-los como branco;
- Incubar em estufa a 37 °C e atmosfera de 5% de CO₂ por 24 h.

Tratamento das células

- Pesar e diluir as drogas em DMSO tal como no ensaio antiproliferativo;
- Preparar as diluições em eppendorf, utilizando meio de cultura com gentamicina, visando obter concentrações finais de 500, 100, 50, 10 e 1 μ g/mL;
- Após a formação da monocamada de células retirar o meio de cultura dos poços e transferir 100 μ L de cada eppendorf para os respectivos poços (ensaio em triplicata);
- Manter pelo menos 3 poços da placa sem a adição da droga (controle);
- Incubar em estufa a 37 °C e atmosfera de 5% de CO₂ por 96 h.

Leitura do experimento

- Após o tempo de incubação retirar o meio de cultura, lavar cada poço com 100 μ L de PBS, retirar o PBS e adicionar 50 μ L de ácido tricloroacético 10%;
- Manter em geladeira por uma hora ao abrigo da luz;
- Desprezar o ácido tricloroacético e lavar em água corrente por 5 vezes, sendo a última em água destilada, após isto deixar a placa secar a temperatura ambiente;
- Adicionar 50 μ L/poço de sulforodamina B (0,4% p/v em 1% de solução aquosa de ácido acético);
- Manter a placa por 30 min em geladeira ao abrigo da luz;
- Lavar a placa por 3 vezes com ácido acético 1% para completa remoção do corante;

- Adicionar 150 µL/poço de tampão Tris-base 10 mM;
- Agitar cuidadosamente a placa e realizar a leitura em Leitor de ELISA a 530 nm.

3.7. Microscopia eletrônica de varredura

O microscópio eletrônico de varredura (MEV) fornece imagens tridimensionais do material avaliado, cuja a qual é formada pela interação inicial de um feixe de elétrons com a amostra em condições de alto vácuo. Nesta interação elétrons secundários provenientes da amostra são arrancados e coletados por uma sonda para formar uma imagem da topografia do material (SOUZA, 1998). Dentre as suas várias aplicações, a microscopia eletrônica de varredura permite avaliar a morfologia celular de micro-organismos expostos a compostos biologicamente ativos.

- Lavar as células em PBS à temperatura ambiente 3 vezes;
- Preparar uma solução de glutaraldeído à 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M;
- Adicionar ao pellet 1 mL da solução de glutaraldeído (fixação propriamente dita);
- Deixar em temperatura ambiente no mínimo 1 h ou na geladeira por até 48 h;
- Lavar as células fixadas com tampão cacodilato de sódio à 0,1 M 3 vezes;
- Lavar o suporte (chip ou lamínula) com acetona e depois com água;
- Aderir as células previamente fixadas neste suporte com poli-l-lisina;
- Lavar 3 vezes com o tampão cacodilato de sódio à 0,1 M;
- Desidratar em etanol 30, 50, 70, 80, 90, 95, 100% (10-15 min cada um, exceto em 100%, que deve-se deixar no álcool por 2 ou 3 vezes este tempo);
- Realizar ponto crítico;
- Metalizar com ouro;
- Observar no Microscópio Eletrônico de Varredura Shimadzu SS-550.

4. REFERÊNCIAS

AMSTERDAM, D. Susceptibility testing of antimicrobials in liquid media. In: **Antibiotics in laboratory medicine**, ed Lorian V. (Williams & Wilkins, Baltimore, Md), 5th ed., 2005, p. 61.

BOSCH, F., ROSICH, L. The contributions of paul ehrlich to pharmacology: a tribute on the occasion of the centenary of his nobel prize. **Pharmacology**, 82(3):171-9, 2008.

CAMARGO, E.P. Growth and differentiation of *Trypanosoma cruzi*: Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. **Rev Inst Med Trop São Paul.**, 6: 93-100, 1964.

CAMPOS, V., STRABELLI, T.M., AMATO NETO, V., SILVA, C.P., BACAL, F., BOCCHI, E.A., STOLF, N.A. – Risk factors for Chagas' disease reactivation after heart transplantation. **Journal of Heart Lung Transplant.**, 27: 597-602, 2008.

CANÇADO, J.R. - Tratamento específico. In *Cardiopatia Chagásica*, (Cançado, J. R. & Chuster, M., Eds). Fundação Carlos Chagas, Belo Horizonte; 327-55, 1985. In ARAÚJO, M.S.S., MARTINS-FILHO, O.A., PEREIRA, M.E.S. , BRENER, Z. – A combination of benznidazole and ketoconazole enhances efficacy of chemotherapy of experimental Chagas' disease. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 45: 819-824, 2000.

CARLIER, Y. – Congenital Chagas disease: from the laboratory to public health. **Bull. Acad. R. Med. Belg.**, 162: 409-416, 2007.

COURA, J.R. ,VIÑAS, P.A. – Chagas disease: a new worldwide challenge. **Nature**, 465: S6-S7, 2010.

COURA, J.R., CASTRO, S.L. – A critical review on Chagas disease chemotherapy. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 97 (1): 3-24, 2002.

DANTAS, A.P., SALOMÃO, K., BARBOSA, H.S., CASTRO, S.L. – The effect of *Bulgarian propolis* against *Trypanosoma cruzi* and during its interaction with host cells. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **101**: 207-211, 2006.

GALVÃO, L.M., NUNES, R.M., CANÇADO, J.R., BRENER, Z., KRETTLI, A.U. - Lytic antibody titre as a means of assessing cure after treatment of Chagas disease: a 10 years follow-up study. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, **87**: 220–3, 1993. In ARAÚJO, M.S.S., MARTINS-FILHO, O.A., PEREIRA, M.E.S., BRENER, Z. – A combination of benznidazole and ketoconazole enhances efficacy of chemotherapy of experimental Chagas' disease. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, **45**: 819-824, 2000.

HERWALDT, B.L. – Laboratory-acquired infections from accidental exposures. **Clinical Microbiology Reviews**, **14(4)**: 659-668, 2001.

Ministério da Saúde, 2010a, acessado em 18/12/2010. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/casos_brasil_2005_a_2010.pdf.

NEVES, D.P. – **Parasitologia Humana**. Livraria Atheneu. 11ªEd., 2005.

NIELMANN, A.; TAKATSUKI, A.; ELSÄSSER, H. P. The lysosomotropic agent monodansylcadaverine also acts as a solvent polarity probe. **J. Histochem. Cytochem.**, **48 (2)**: 251-258, 2001.

PINTO DIAS, J.C. – Globalização, iniquidade e doença de Chagas. **Caderno de Saúde Pública**, **23 Sup. 1**: S13-S22, 2007.

PINTO DIAS, J.C. – The treatment of Chagas disease (South American trypanosomiasis). **Ann. Intern. Med.** **144**: 772-774, 2006.

PRATA, A. – Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. **The Lancet Infectious Diseases**, **1**: 91-100, 2001.

RASSI JÚNIOR, A., RASSI, A., MARIN-NETO, J.A. – Chagas disease. **Lancet**, **375**: 1388-402, 2010.

SEPKOWITZ, K.A. One hundred years of Salvarsan. **N Engl J Med**. 365(4):291-3, 2011.

SILVA JÚNIOR, E.N., DE SOUZA, M.C.B.V., FERNANDES, M.C., MENNA-BARRETO, R.F.S., PINTO, M.C.F.R., LOPES, F.A., DE SIMONE, C.A., ANDRADE, C.K.Z., PINTO, A.V., FERREIRA, V.F., DE CASTRO, S.L. – Synthesis and anti-*Trypanosoma cruzi* activity of derivatives from nor-lapachones and lapachones. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, **16**: 5030-5038, 2008.

SILVA JÚNIOR, E.N., GUIMARÃES, T.T., MENNA-BARRETO, R.F.S., PINTO, M.C.F.R., SIMONE, C.A., PESSOA, C., CAVALCANTI, B.C., SABINO, J.R., ANDRADE, C.K.Z., GOULART, M.O.F., DE CASTRO, S.L., PINTO, A.V. - The evaluation of quinonoid compounds against *Trypanosoma cruzi*: synthesis of imidazolic anthraquinones, nor-beta-lapachone derivatives and beta-lapachone-based 1,2,3-triazoles. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, **18**: 3224-3230, 2010.

SOUZA, W. **Técnicas básicas de microscopia eletrônica aplicada às ciências biológicas**. Rio de Janeiro, Sociedade Brasileira de Microscopia, 1998.

TONIN, L.T.D., PANICE, M.R., NAKAMURA, C.V., ROCHA, K.J.P., DOS SANTOS, A.O., UEDA-NAKAMURA, T., DA COSTA, W.F., SARRAGIOTTO, M.H. Antitrypanosomal and antileishmanial activities of novel N-alkyl-(1-phenylsubstituted- β -carbonile)-3-carboxamides. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, **64**: 386-389, 2010.